

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.

JN 1169495
SEP 1985

<p>36-077694/12 B04 D16 S03 TAKEDA CHEMICAL IND KK TAKE 15.02.84 *J6 0169-495-A 15.02.84-JP-027775 (02.09.85) C07h-21/04 C12n-15 G01n-33/53 New polydeoxy:nucleotide for diagnosing hepatitis B etc. - obt. by linking hapten to phosphoric acid portion opt. via ligand C86-033074</p>	<p>B(4-B4A1, 12-K4A1, 12-K4A4) D(5-H6, 5-H9, 5-H12) 3</p> <p>acid portion of a polydeoxynucleotide via a ligand, e.g. -A-Z(A = bond or -X-(CH₂)_n-; X = O, NH or bond; Z = O or NH); particularly suitable is -NH-(CH₂)_nNH-</p> <p>DETECTION PROCEDURE</p> <p>PN to be detected is fixed to a support such as nitrocellulose filter in conventional manner, and if desired denatured with alkali or by heating to form a single chain PN.</p> <p>The filter contg. fixed PN is hybridized with (I) in a buffer, reacted with anti-hapten IgG or antiserum, then further reacted with enzyme- or fluorescence-labelled anti-IgG antibody.</p> <p>Substrate is suitable hydrogen peroxide, and dye is e.g. ortho-dianisidine.(5ppW108DAHDwgNo0/0).</p>
<p>A novel polydeoxynucleotide (I) is obt. by linking a hapten to the 5' terminal phosphoric acid portion directly or via a ligand.</p> <p>USE</p> <p>For detecting a specific base sequence in a polynucleotide (PN) by hybridizing (I) with PN in cells or fixed to a support introducing fluorescence or enzyme label to the resulting hybrid immunologically, and detecting the photoresponse generated by photoexcitation or substrate addition.</p> <p>Genes of HBV, ATLAV or HLA can be detected, and the method is valuable in diagnosis of hepatitis B and adult leukaemia.</p> <p>HAPten</p> <p>Suitable haptens are 2,4-dinitrophenyl, biotinyl, aldosterone, testosterone and diphenylhydantoin.</p> <p>The hapten is pref. bonded to the 5' terminal phosphoric</p>	<p>J60169495-A</p>

© 1986 DERWENT PUBLICATIONS LTD.

128, Theobalds Road, London WC1X 8RP, England

US Office: Derwent Inc. Suite 500, 6845 Elm St. McLean, VA 22101

Unauthorised copying of this abstract not permitted.

⑪ 公開特許公報 (A) 昭60-169495

⑫ Int.Cl.	識別記号	厅内整理番号	⑬ 公開 昭和60年(1985)9月2日
C 07 H 21/04		7252-4C	
C 12 N 15/00		7115-4B	
G 01 N 33/53		7906-2G	
// A 61 K 39/295		7043-4C	審査請求 未請求 発明の数 2 (全5頁)

⑭ 発明の名称 変性されたDNAおよびその用途

⑮ 特願 昭59-27775

⑯ 出願 昭59(1984)2月15日

⑰ 発明者 福田 常彦 京都市西京区大原野西境谷町2-9番10-202号

⑱ 発明者 丸本 龍二 芦屋市奥池南町53番1号

⑲ 出願人 武田薬品工業株式会社 大阪市東区道修町2丁目27番地

⑳ 代理人 弁理士 天井 作次

明細書

1. 発明の名称

変性されたDNAおよびその用途

2. 特許請求の範囲

- (1) 5末端のリン酸基に直接またはリガンドを経てヘプテンを結合せしめてなるポリデオキシヌクレオチド。
- (2) 5末端のリン酸基に直接またはリガンドを経てヘプテンを結合せしめてなるポリデオキシヌクレオチドを、細胞中あるいは支持体に固定された試料中のポリヌクレオチドとハイブリダイズさせ、該ハイブリドに免疫学的手法で蛍光または酵素標識を導入し、光効起または基質感加によつて生じる光応答を検知することを特徴とするポリヌクレオチド中の特定塩基配列の検出法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は変性された新規DNAおよびその用途に関するものである。

生化学研究において放射性同位元素を用いる実験は敏感な方法として広く利用されている。しか

し被曝の危険性や廃棄物処理などに慎重な配慮が要求され、これらの実験を行う上には莫大な費用と特殊な空間を要する。さらに³²Pおよび¹²⁵Iなどの半減期は短かく、これらを含有する試薬は保存がきかないため用事調製といつた不便さがつきまとう。

一方、現在分子生物学において特定の遺伝子の検出あるいは同定のために、それらと相補的な塩基配列を持つデオキシヌクレオチド（以下DNAと略記することがある）あるいはRNAフラグメントによる核酸ハイブリッド形成法が運用されている。現在この方法は主として³²Pを使用しているが、その短い寿命故に基質研究のみに限定され、病院などにおける臨床検査の一手段としては利用されていない。

ウイルス遺伝子あるいは診断に適する異常染色体など特定DNA配列を簡便かつ迅速に検出することは臨床において特に重要であり、ある種のウイルス性疾患のように抗原が検出されない場合でも、生体組織中のウイルスゲノムを直接受ける

ことが述べられている。

最近、非放射性免疫診断法は充分放射性免疫診断法に匹敵することが示されているが、本発明者は蛍光免疫アッセイや酵素免疫アッセイの手法を核酸ハイブリッド形成法と結合させることにより高感度の特定遺伝子診断法を開発できると考え、現在研究を行い本発明を完成した。

すなわち本発明は、5'末端のリン酸部に直接またはリガンドを経てハプテンを結合せしめてなるポリデオキシヌクレオチド、ならびに該ポリデオキシヌクレオチドを細胞中あるいは支持体に固定された試料中のポリヌクレオチドとハイブリダイズさせ、該ハイブリッドに免疫学的手法で蛍光または酵素標識を導入し、光励起または蒸発によって生じる光応答を検知することを特徴とするポリヌクレオチド中の特定塩基配列の検出法を提供するものである。

上記変性されたポリデオキシヌクレオチドに図し、ハプテンは低分子であつても抗原性を有するものであればいずれでもよいが、ハプテンに対する

抗体の入手容易性から2,4-ジニトロフェニルなどのジニトロベンゼン誘導体、ビオナノイル、イミノビオナノイルなどビオチン誘導体、アルドステロン、17-β-エストラジオール、テストステロンなどステロイド類、ジフェニルヒダントイインなどヒダントイン誘導体が挙げられ、とりわけ2,4-ジニトロフェニルが好ましい。

ハプテンは直接ポリデオキシヌクレオチドの5'末端のリン酸部に結合していてもよいが、リガンドを経てポリデオキシヌクレオチドの5'末端のリン酸部に結合していることが好ましい。該リガンドとしては、式-A-Z-〔式中、Aは結合手または式-X-(CH₂)_n-（XはO、Nまたは結合手を、nは1～8の整数を示す）を、ZはOまたはNHを示し、ハプテンはAに、ヌクレオチドの5'末端リン酸部はZに結合している〕で表わされる基が挙げられる。なかでもリガンドとして式、-NH-(CH₂)_nNH-（nは上記と同意味）であるものが好ましく、とりわけnが2であるものが好ましい。

上記ポリデオキシヌクレオチド（以下、ポリDNAと略称することがある）は、検出対象となる遺伝子、ウイルスなどのポリヌクレオチドの特定塩基配列に相補的なポリDNAである。該ポリDNAは塩基数として8以上、好ましくは12～1.000である。

上記ポリDNAに関して、ポリDNAの鎖長の短いものは公知の化学合成によつて大量に得ることも容易である。鎖長の長いものは、ハイブリッド化形成能の点で劣るためにC、O含量の高いものが好ましい。一般にゲノムの特定な箇所を特異的に検出する場合には比較的鎖長の長いものがふさわしく、鎖長の長いプローブはゲノムの広領域にわたつて同定・検出する場合には有用であるが、若干特異性を欠く傾向にある。

比較的長い鎖長のプローブは、クローニングされたDNAを二本鎖のまま制限酵素によつて切り出されるが、ここで得られる員つた鎖長フラグメントはゲル電気泳動などで分離して使用されてもよいが、混合物のままハプテン化しても有利に使

用できる。

本発明の変性されたDNAを、例えばB型肝炎ウイルスの存在を検出するために用いる場合、ポリDNAとして例えば、表面抗原蛋白遺伝子とコア蛋白遺伝子との間に存在する塩基配列に相補的なTCTTATGTAAGACCTであるか、B型肝炎ウイルスDNAを制限酵素Sau3Aで分解して得られる平均200塩基対のポリDNAであることが好ましい。

本発明の変性されたDNAは、完全なポリDNAに、所選によりリガンドを有するハプテン化試薬を反応させるかまたはハプテンを有するポリDNAの一部を残りのポリDNAまたはDNAと結合させることにより製造できる。

具体的には、例えば2,4-ジニトロフェニルエチレンジアミンやビオチンなどハプテン化試薬とポリDNAとを結合して製造することができる。

ハプテン化試薬の有するアミノ基をポリDNAのリン酸残基と反応させる場合は、トリフエニルホスファイトと2,2-ジピリミジルジスルファイド

(I) $(\text{PhNH}_2)_2\overset{\text{O}}{\text{P}}-\text{TCTT}$ の合成：

5'保護基を除いたトリマー(C T T) 100 mgと3'-保護基を除いた $(\text{PhNH}_2)_2\overset{\text{O}}{\text{P}}-\text{T}$ 50 mgとを乾燥ビリジン 1 g 中メチレンスルホニルニトロトリアゾール(M S N T) 70 mgの存在下1時間結合。反応液に少量の水を加え、濃縮乾固。残渣をアセトンに溶解し、白濁するまで水を加えたのちリクロプレツプR P - 8(メルク社) 30 mlのカラムに吸着させ、アセトン-酢酸トリエチルアミン(0.01 M) 3 : 2 v/v 混液 100 mlで洗い、次いで上記 7 : 3 v/v 混液 100 mlで溶出される分画を濃縮乾固。残留物を少量のクロロホルムに溶解し、これをシクロヘキサン中に落下して得られる沈殿を遠心分離し、白色粉末 84 mgを得た。

(II) $(\text{PhNH}_2)_2\overset{\text{O}}{\text{P}}-\text{TCTTATGT}$ の合成：

(I)の方法で得られたアトマー 40 mgと常法に^{付録}よつて合成された A T G T 40 mgとを常法通り R S T 100 mgで結合させ、(I)の方法と同様にして粉末状の目的物 60 mgを得た。

(III) $(\text{PhNH}_2)_2\overset{\text{O}}{\text{P}}-\text{TCTTATGTTAAAGACCTOBz}$ の合成(完全保護ペントデカマー)：

(II)の方法で得たオクタマー 40 mgと3'末端の水酸基がベンゾイル基で保護されたアトマー A A G A C C T O B z 40 mgとを M S N T 100 mgを用いて結合し、常法に従つて目的物 60 mgを単離した。

(IV) 完全保護ペントデカマーの保護基除去：

完全保護ペントデカマー 60 mgを酢酸-トリエチルアミン混液(2 : 1 v/v) 1.5 mlに溶解。亜硝酸イソアミル 0.15 mlを加え 35 °C で 7 時間搅拌。反応液を濃縮乾固したのち、ビリジンを加えて再度濃縮し、亜硝酸イソアミルを完全に除去。残渣にアンモニア水 5 mlを加え 25 °C で 20 時間密栓放置したのち、60 °C で 4 時間加熱。アンモニア水を留去し、残渣を 0.01 M 亜炭酸トリエチルアミンに落かし、エーテルで 2 回洗浄。次にセファデックス G - 50 で最初に溶出される分画を分取し、続いてイオン交換高濃度液体クロマトグラフィー(パーテル S A X - 10, × 0.4 × 3.0 cm, NaH_2PO_4 稀釣液(pH 6.3)による直

線勾配溶出法, 0.15 M (1.5% エタノール含有)から 0.3 M (3.0% エタノール含有)まで 10 分間で変化)において最も遅く溶出される主分画を分取し、S E P - P A K (ウォーターズ)で脱塩し、逆相高濃度液体クロマトグラフィー(メタレオール-C₁₈)で單一のピーカーを示すもの 3.5 mlを得た。本品は細菌のアルカリホスファターゼで 5'位を脱構成したのち、³²Pで 7'位を標識した A T P とポリヌクレオチドキナーゼで 5'位を放射標識し、マキサム-ギルバート法によつて目的とする塩基配列に一致することを確認した。

実施例 3

実施例 2 で得たペントデカマー 850 μg を水 3.0 ml に溶解。ここに 2', 4'-ジニトロフェニルエレンジアミン 1.3 mg の N, N-ジメチルホルムアミド溶液 3.0 ml を加え、更に 0 °C でトリフエニルホスファイン 3.9 mg と 2', 2'-ジビリジルジスルフィド 3.3 mg を加えた。その後同温度で 1 時間毎にトリフエニルホスファインと 2', 2'-ジビリジルジスルフィドを一回目と同量にさらに

2 度にわたつて加え、反応液に水 2 ml を加え、即ちエーテル 2 ml で 2 度洗浄した。水層を濃縮乾固し、残渣を少量の 0.01 M 亜炭酸トリエチルアミンに落かし、セファデックス G - 50。次いで高濃度液体クロマトグラフィー(パーテル S A X - 10)によつて精製し、2.00 ml の黄色粉末として、2', 4'-ジニトロフェニル-NHCH₂CH₂NH-PO₂-TCTTATGTTAAAGACCT (DNA プローブ)を得た。

実施例 4

B 型肝炎ウイルス Ad 2 の全遺伝子を含む pBR 322 由来のプラスミド pBR322-EcoRI/HBV 933 (特開昭58-194897号公報参照) 1 μg を EcoRI で切断し、アガロース電気泳動に付し、臭化エチジウムで蓄光染色すると二本のバンドが検出された。分子量の大きいバンド(ウイスルゲノムを含む)をニトロセルロースに転位させ、セルロース上に固定された DNA を 80 °C で 3 時間加熱変性させ、フィルターを実施例 3 で得られた DNA プローブ 2 μg と稀釣液 2.0 ml

など脱水剤の存在下反応させることができ、通常N,N-ジメチルカルムアミド、ジメチルスルオキシド、水やこれらの混合物など極性溶媒中を行う。反応温度は-10~10°Cである。

ハブテン化試薬の有するカルボキシル基を反応させる場合は、成ヘロゲン化物として用いることが好ましい。

かくして得られる本発明の変性されたDNAは、抽出・カラムクロマトグラフィー・再結晶・再沈殿など通常の化学的操作により分離・精製することができる。

本発明の変性されたDNAは低毒性であり、安全に、例えば以下の用途に用いることができる。

本発明の変性されたDNAを用いるポリメクレオチド中の特定塩基配列の検出は、例えば以下の方法によつて行うことができる。

検出しようとするポリメクレオチドを常法によりニトロセルロースフィルター等の支持体に固定し、所望によりアルカリ・加熱等により変性させ、一本鎖ポリメクレオチドとする。

上記メクレオチドを固定したフィルターとハブテン化されたDNA(DNAプローブ)を緩衝液中でハイブリダイズさせる。

上記処理したフィルターを、トリス-塩酸・ヒトアルブミン等を含有する食塩水で洗浄し、ウサギ抗ジニトロフェニル片血清アルブミン(ウサギ抗DNP-BSA)など抗ハブテンIgGあるいは抗血清と反応させる。抗ハブテンIgG等は、ヒトアルブミンやウサギ血清を含む希釈食塩水として用いることが好ましい。

食塩水等で洗浄後、該反応させたフィルターを西洋ワナビ・ベルオキシダーゼ標識したヤギ抗ウサギIgG 抗体など各種ベルオキシダーゼやルシフェラーゼで標識した抗IgG 抗体やエテノスクレオチド、アミノヘキサンアデノシンスクレオチドなどで蛍光標識した抗IgG 抗体と反応させる。該反応はヒトアルブミンやウサギ血清等の共存する食塩水中で行うことが好ましい。

上記反応したフィルターを光動起または基質液加して、生ずる光応答を検知することによりポリ

メクレオチド中の特定塩基配列の有無を知ることができる。基質としては過酸化水素など、発色剤としてはオルトジアニシジンなどを例示することができる。

本発明の変性されたDNAを用いるポリメクレオチド中の特定塩基配列の検出法により、B型肝炎ウイルス(HBV)、成人白血病ウイルス(HTLV)、人白血球抗原(HLA)等の遺伝子を検出することができ、B型肝炎や成人白血病等の診断やHLA型判定のために有用である。

具体的には、診断の対象となる動物(マウス、イヌ、ヒトなど)の血清等を用い本願明細書実施例6記載の方法や公知(例えば、アロシーディング・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス U.S.A 第79巻、7522-7526頁、1982年)の方法に準じて行うことができる。

本願明細書中記述の意図は以下のとおりである。
A: デオキシアデニム塩酸基 C: デオキシシカジル塩酸基
T: チミジル塩酸基 Ph: フェニル
G: デオキシグアニム塩酸基 Be: ベンゾイル

以下実施例によつて本発明を具体的に説明する

が、本発明はこれらに制限されるものではない。

実施例中、保護されたメクレオチドの保護基は、5位についてはジメトキシトリチルであり、リソ酸については α -クロロフェニルと β -シアノエチルである。

- 実施例1 ($\text{PhNH}_2\text{P}(\text{O})_2\text{OT}$)の合成:

5位を脱保護した保護T460mgと1-メチルイミダゾール120mgをピリジン10mlに溶解し、ジフェニルアミノ鋼酸クロリド400mgを加えた。6時間後と20時間後に上記脱保護剤400mgと1-メチルイミダゾール120mgを追加し、4時間後に1M酢酸カリウム5mlを加えて10分間搅拌。反応液にクロロホルム20mlを加えて抽出し、クロロホルム層を0.5M鋼酸二水素カリウム、次いで水で洗い、濃縮乾固。残留物をシリカゲル30gを用い、 $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (97:3)で精製し、目的物370mgを得た。Rf=0.11
(キーゼルゲル 60F-254、メルク社、クロロホルム-メタノール 19:1V/V)

- 実施例2

中でハイブリダイズさせた。セルロースを3%のヒト・アルブミンを含む食塩水(9%NaClの10 mMトリス-塩酸緩衝液、pH 7.4)に浸し、食塩水で洗い、ウサギ抗DNP-BSA血清(10倍稀釈)の3%ヒト・アルブミン、10%ヤギ血清を含む食塩水稀釈液に2時間浸した。食塩水で5回洗い、西洋ワビ・ベルオキシダーゼ標識したヤギ抗ウサギIgG抗体(200倍稀釈)の3%ヒト・アルブミン、10%ヤギ血清を含む食塩水に2時間浸した。再び食塩水で5回洗い、0.0025%オルトジアニシン、0.01%過酸化水素(10 mMトリス-塩酸緩衝液、pH 7.4)に30分間浸し、水洗。乾燥すると、ウイルスゲノムを含むバンドのみ赤褐色を呈し、pBR322由来のバンドは全く着色しなかつた。

実施例5

アラスミドpBR322 IC3型肝炎ウイルスDNAを組み込みクローニングして得られるアラスミドpBR322-EcoRI/HBV933(前出)2.3 mgを制限酵素EcoRIで消化し、アガロースゲル電

気吹動で分離精製し、肝炎ウイルスDNA(470 μg)を得た。この内390 μgを制限酵素Sau3Aで分解後、精製して平均200基基対のDNAフラグメントを含む混合物(220 μg)を得た。このDNAのうち50 μgを2,4-ジニトロフェニルエチレンジアミン(13.5 mg)と共にN,N-ジメチルホルムアミド(30 μl)-水(30 μl)の混合液に浴かし、氷冷下にトリフェニルホスファイン(3.9 mg)と2,2-ジピリミジルジスルファイド(3.3 mg)を加えた。後2者の試薬を1時間毎にさらに2回加え、最後に加えてから1時間後に水(1 ml)と酢酸エチル(4 ml)を加えて抽出した。水層を濾過し、この溶液をカラム法アフクス0-25のカラム(0.6 × 25 cm)の上端に注いだ。カラムを0.15モルの食塩を含むトリス-塩酸緩衝液(20ミリモル濃度、pH 8.0)で脱脂し、最も早く溶出するピークを集めた。エタノール沈殿により、2,4-ジニトロフェニルで修飾されたDNA混合物(40 μg)を得た。ニトロセルロースフィルターにアラスミド

pBR322-EcoRI/HBV933の種々の濃度の希釈水溶液をスポットし、80℃、3時間加熱乾燥し、次いでこのフィルターを常法どおりハイブリダイゼーションの前処理に付した。前述のジニトロフェニルエチレンジアミンでハプテン化したDNA(1 μg)をプローブとし、400 μlの溶液中、40度16時間、フィルター上に固定したDNAとハイブリダイゼーションさせた。以後、実施例4と同様の標準免疫法の諸過程を施した。その結果フィルター上の1ナノグラムのpBR322-EcoRI/HBV933のスポットにまで明らかなる発色が認められた。

実施例6

B型肝炎表面抗原キャリヤーの血清(30.0 μg)を2%のドデシル硫酸ナトリウム、サケ精液DNA(40 μg/ml)およびブコティナーゼK(2.4 ml)を含む15.0 mM食塩/10 mM EDTA/10 mMトリス塩酸(25.0 μl)中に加え、37度で4時間インキュベートしたのち、等容の上記緩衝液を濾過したエタノール、次いでクロロ

代代理人弁理士天井作次

